

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.12.002

直链烷基苯磺酸钠对雌性小鼠卵巢类固醇激素合成的影响*

刘小强¹, 李 丹², 王 琦¹, 任春娥^{3△}

(1. 山东省青岛市妇女儿童医院, 山东 青岛 266034; 2. 山东省青岛市中心医院, 山东 青岛 266031;
3. 潍坊医学院附属医院, 山东 潍坊 261031)

摘要:目的 探讨直链烷基苯磺酸钠(LAS)对雌性小鼠卵巢类固醇激素合成的影响。方法 将40只妊娠小鼠随机分为研究组和对照组,各20只。研究组于妊娠第5~20天以150 mg/(kg·d) LAS灌胃染毒,对照组小鼠同期每天以等量生理盐水灌胃。两组均正常分娩,观察其子代雌性小鼠发育情况至10周龄,在子代雌性小鼠发情间期处死,用酶联免疫吸附(ELISA)法检测并比较两组子代雌性小鼠血清卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇(E₂)及睾酮(T)等类固醇激素水平,血清超氧化物歧化酶(SOD)活力及丙二醛(MDA)等氧化应激指标水平,并对其卵巢中类固醇激素急性调节蛋白(StAR)、细胞色素P450胆固醇侧链裂解酶(P450_{scc}) mRNA表达量进行检测和比较。结果 子代雌性小鼠研究组13只,对照组15只;与对照组子代雌性小鼠比较,研究组子代雌性小鼠的血清类固醇激素水平、血清SOD活力及卵巢StAR和P450_{scc} mRNA相对表达量均降低,血清MDA水平则升高($P < 0.05$);Pearson线性相关分析结果显示,研究组子代雌性小鼠血清SOD活力与其血清类固醇激素水平及卵巢StAR和P450_{scc} mRNA相对表达量均呈正相关($r = 0.866, 0.805, 0.798, 0.836, 0.818, 0.897, P < 0.05$),其血清MDA水平与其血清类固醇激素水平及卵巢StAR和P450_{scc} mRNA相对表达量则呈负相关($r = -0.811, -0.835, -0.872, -0.818, -0.806, -0.857, P < 0.05$)。结论 LAS可影响雌性小鼠卵巢类固醇激素合成,而氧化应激可能为LAS影响卵巢类固醇激素合成的机制。

关键词:直链烷基苯磺酸钠;雌性;小鼠;卵巢;类固醇激素;合成;氧化应激

中图分类号:R965;R715.3

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)12-0005-04

Effect of Linear Alkylbenzene Sulfonate on Synthesis of Steroid Hormone in Ovaries of Female Mice

Liu Xiaoqiang¹, Li Dan², Wang Qi¹, Ren Chun'e³

(1. Shandong Qingdao Women's and Children's Hospital, Qingdao, Shandong, China 266034; 2. Central Hospital of Qingdao, Qingdao, Shandong, China 266031; 3. Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang, Shandong, China 261031)

Abstract: Objective To investigate the effect of Linear Alkylbenzene Sulfonate(LAS) on synthesis of steroid hormone in ovaries of female mice. **Methods** Totally 40 pregnant mice were randomly divided into the study group and the control group, 20 cases in each group. The study group was given 150 mg/(kg·d) LAS by gavage every day during 5~20 d of pregnancy, and the control group was given the same amount of normal saline by gavage every day in the same period. The two groups were normal childbirth, and the development of offspring female mice were observed to 10 weeks of age, and then the offspring female mice were killed in diestrus. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) method was adopted in the detection and comparison of offspring female mice serum follicle stimulating hormone(FSH), luteinizing hormone(LH), estradiol(E₂) and testosterone(T) and other steroid hormone levels, and serum superoxide dismutase(SOD) activity, malondialdehyde(MDA) and other oxidative stress indicators levels in the two groups. The ovarian steroid acute regulatory protein(StAR) and cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage(P450_{scc}) mRNA expression were detected and compared in the two groups. **Results** There were 13 offspring female mice in the study group and 15 offspring female mice in the control group. Compared with those of the offspring female mice of the control group, the serum steroid hormone level, serum SOD activity level, ovary StAR and P450_{scc} mRNA relative expression level of the offspring female mice of the study group were decreased, while the serum MDA level of the offspring female mice of the study group was increased($P < 0.05$). Pearson linear correlation analysis showed that the serum SOD activity level of the offspring female mice of the study group was positively correlated with the serum steroid hormone level and the ovaries StAR and P450_{scc} mRNA relative expression level($r = 0.866, 0.805, 0.798, 0.836, 0.818, 0.897, P < 0.05$), while the serum MDA level of the offspring female mice of the study group was negatively correlated with the serum steroid hormone level and the ovaries StAR and P450_{scc} mRNA relative expression level($r = -0.811, -0.835, -0.872, -0.818, -0.806, -0.857, P < 0.05$). **Conclusion** LAS can affect the synthesis of steroid hormone in the ovaries of female mice, and oxidative stress may be the mechanism of LAS affecting the synthesis of ovarian steroid hormone.

Key words: Linear Alkylbenzene Sulfonate; female; mouse; ovary; steroid hormone; synthesis; oxidative stress

*基金项目:山东省自然科学基金资助项目[ZR2015HL020]。

第一作者:刘小强(1983-),男,硕士研究生,主治医师,研究方向为妇科内分泌疾病的诊治,(电话)0532-68661155(电子信箱)lxq_890@126.com。

△通信作者:任春娥(1963-),女,大学本科,教授,研究方向为生殖医学与辅助生育技术,(电子信箱)wyfybaby@126.com。

生殖健康为目前日益凸显的医疗难题,环境污染可引起生殖细胞损伤而导致胎源性疾病发生,继而影响胚胎发育和新生代健康^[1-2]。表面活性剂为人工合成的化学洗涤剂,日常应用频繁,可通过人体直接接触、餐具、蔬果残留等多种途径进入人体。直链烷基苯磺酸钠(linear alkylbenzene sulfonate, LAS)是常见化学洗涤剂中的表面活性剂成分,在人体内含量虽小,但难以消除,长期蓄积会影响动物生殖系统^[3-4]。LAS暴露对机体生殖系统的作用受到其暴露的浓度、时间、体内代谢方式等多种因素的影响,而在现实生活中受实验技术及伦理学等限制, LAS 暴露对宫内胚胎及生育功能影响的研究难以展开,主要通过小鼠等动物进行研究^[5]。为明确 LAS 对雌性子代生殖系统的影响,本研究中通过 LAS 染毒妊娠小鼠,观察其子代类固醇激素合成情况及可能机制,为预防和干预 LAS 对生殖系统的影响提供依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试剂

1.1.1 动物

40 只妊娠小鼠均来源于南京大学模式动物研究中心,实验动物许可证号为 scxk(苏)2010-0001,购买后均单笼饲养,自由摄食和饮水,昼夜节律正常。本研究符合伦理学标准,并经我院伦理学委员会审核批准。

1.1.2 仪器与试剂

详见表 1。

表 1 仪器与试剂名称及其来源

产品名称	来源
Thermo MK3 型酶标仪	美国 Thermo 公司
ELISA 试剂盒	南京森贝伽生物科技有限公司
恒温箱	江苏佳美仪器有限公司
微量移液器	德国艾本德公司
5810R 型大容量冷冻离心机	德国艾本德公司
T100 型 PCR 仪	美国伯乐公司
RNA 提取试剂盒	德国 Qiagen 公司
cDNA 合成试剂盒	美国 Promega 公司
实时定量 PCR 试剂盒和 SYBR Premix EX Taq	日本 Takara 公司
离心管、玻璃瓶、吸管、试管等	广东东普医疗科技有限公司
WD-9408C 型电泳系统	北京六一仪器厂
直链烷基苯磺酸钠(LAS)	天津市鼎盛鑫化工有限公司

1.2 方法

1.2.1 分组

将 40 只小鼠进行编号,并按随机数字表法分为研究组和对照组,各 20 只。分组信息贴于笼子显眼位置,避免后续处理错漏。两组小鼠的性别、妊娠时间、入组时

体质量等一般资料比较均无明显差异($P > 0.05$),具有可比性。详见表 2。

表 2 两组小鼠一般资料比较($n = 20$)

组别	性别	妊娠时间($\bar{X} \pm s, d$)	体质量($\bar{X} \pm s, g$)
研究组	雌性	3.22 $\pm$ 0.65	22.63 $\pm$ 2.85
对照组	雌性	3.28 $\pm$ 0.28	23.46 $\pm$ 2.39
t 值	-	0.379	0.998
P	-	> 0.05	> 0.05

1.2.2 给药

研究组于妊娠第 5~20 天以生理盐水为溶剂,每天以 150 mg/kg LAS(CAS 号为 25155-30-0)灌胃染毒,灌胃溶液体积为每 10 g 体质量 1 mL,期间每 5 天称 1 次体质量,并相应调整灌胃溶液体积。对照组小鼠同期每天以等量生理盐水灌胃。

1.2.3 子代分娩及处理

两组小鼠均饲养至分娩,期间无死亡,均正常分娩。选出两组子代雌性小鼠,饲养条件同母代小鼠,饲养、观察子代雌性小鼠发育情况至 10 周龄,子代雌性小鼠发情间期颈椎脱臼处死,取血和卵巢于液氮中速冻冷藏。

1.2.4 血清指标检测

取获得的血液标本以 3 500 r/min 的转速和 3 cm 半径离心处理 10 min,分离出上层血清,用于相关指标检测,采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测并比较两组子代雌性小鼠血清卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇(E₂)及睾酮(T)等类固醇激素水平和血清超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)等氧化应激指标水平,操作均由同一相关检测经验 3 年以上检验科人员进行,具体操作严格仪器及试剂盒说明书进行。

1.2.5 聚合酶链反应(PCR)检测和电泳分析

取子代雌性小鼠卵巢,Trizol 法常规提取总 RNA 后逆转录合成 cDNA,以 β -actin 作为内参照,对卵巢中类固醇激素急性调节蛋白(StAR)、细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶(P450_{scc}) mRNA 相对表达量进行检测,其中 StAR 上游引物为 5'-CTGCTAGACCAGCCCATG-GAC-3',下游引物为 5'-TGATTTCTTGACATTT-GGGTTCC-3',片段大小 546 bp;P450_{scc} 上游引物为 5'-TCCAGAGGACCCAGGTTCAA-3',下游引物为 5'-CATCAGGTGTCAAATCTTGGACTT-3',片段大小 496 bp; β -actin 上游引物为 5'-TAAAGACCTCTATGCCAA-CACAG-3',下游引物为 5'-CACGGATGGAGGGGCGACTCATC-3',片段大小 241 bp。反应体系 20 μ L,含

2 μL 的 $10 \times \text{Taq Buffer}$, 1.5 μL 的 25 mmol/L MgCl_2 , 1 μL 的 10 mmol/L dNTP, 1 μL 的 10 pmol/ μL 相应上游引物, 1 μL 的 10 pmol/ μL 相应下游引物, 1.5 μL 的 cDNA 模板, 10.5 μL 的 DEPC 水, 0.5 μL 的 1 U/ μL Taq 酶。具体 PCR 反应条件: StAR: 94 $^\circ\text{C}$ 4 min、94 $^\circ\text{C}$ 0.5 min、50 $^\circ\text{C}$ 0.5 min、72 $^\circ\text{C}$ 0.5 min、72 $^\circ\text{C}$ 5 min, 共 35 个循环; P450_{scc}: 94 $^\circ\text{C}$ 4 min、94 $^\circ\text{C}$ 0.5 min、50 $^\circ\text{C}$ 0.5 min、72 $^\circ\text{C}$ 0.5 min、72 $^\circ\text{C}$ 5 min, 共 30 个循环; β -actin 反应条件与目的条件一致。取 5 μL PCR 产物常规行凝胶电泳, 紫外灯下拍照后采用 Image pro Plus 图像分析系统计算光密度值, 将目的基因与 β -actin 基因光密度值比值为目的基因相对表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析。计量资料均符合正态分布, 组间比较采用独立样本 t 检验, 采用 Pearson

线性相关分析法分析研究组子代雌性小鼠血清氧化应激指标水平与其血清类固醇激素水平, 以及卵巢 StAR 和 P450_{scc} mRNA 相对表达量的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组子代性别

两组小鼠均为单胎妊娠。研究组子代雌性小鼠 13 只, 雄性 7 只; 对照组子代雌性小鼠 15 只, 雄性 5 只。

2.2 两组雌性子代血清类固醇激素、氧化应激指标水平及卵巢不同 mRNA 相对表达量

与对照组子代雌性小鼠比较, 研究组子代雌性小鼠的血清 FSH, LH, E_2 , T 等类固醇激素水平, 血清 SOD 活力, 以及卵巢 StAR 和 P450_{scc} mRNA 相对表达量均降低, 血清 MDA 水平则升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见表 3、图 1 和图 2。

表 3 两组子代雌性小鼠血清类固醇激素、氧化应激指标水平及卵巢 StAR 和 P450_{scc} mRNA 相对表达量比较 ($n = 20$)

指标	研究组	对照组	t 值	P
FSH(U/L)	30.55 $\pm$ 6.85	37.21 $\pm$ 7.88	2.853	< 0.05
LH(ng/L)	35.96 $\pm$ 5.42	44.87 $\pm$ 9.21	3.727	< 0.05
E_2 (ng/L)	150.44 $\pm$ 15.78	176.85 $\pm$ 18.62	4.839	< 0.05
T(ng/L)	295.78 $\pm$ 23.45	365.96 $\pm$ 36.58	7.223	< 0.05
SOD 活力(U/mL)	122.76 $\pm$ 13.55	148.25 $\pm$ 17.68	5.118	< 0.05
MDA(mmol/mL)	11.26 $\pm$ 3.45	6.33 $\pm$ 2.38	5.260	< 0.05
StAR mRNA 相对表达量	0.52 $\pm$ 0.06	0.63 $\pm$ 0.09	4.548	< 0.05
P450 _{scc} mRNA 相对表达量	0.50 $\pm$ 0.12	0.71 $\pm$ 0.08	6.512	< 0.05

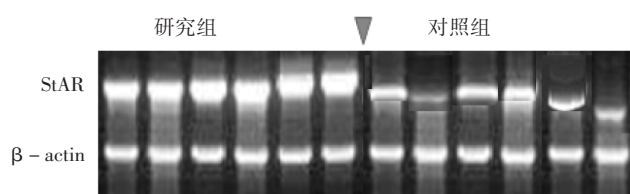


图 1 两组子代雌性小鼠卵巢 StAR 及 mRNA 相对表达量

2.3 研究组雌性子代血清氧化应激指标与类固醇激素及卵巢不同 mRNA 相对表达量的相关性

Pearson 线性相关分析结果显示, 研究组子代雌性小鼠血清 SOD 活力与其血清 FSH, LH, E_2 , T 等类固醇激素水平及卵巢 StAR 和 P450_{scc} mRNA 相对表达量均呈正相关 ($r = 0.866, 0.805, 0.798, 0.836, 0.818, 0.897$, $P < 0.05$), 其血清 MDA 水平与前述类固醇激素水平及卵巢 StAR 和 P450_{scc} mRNA 相对表达量则呈负相关 ($r = -0.811, -0.835, -0.872, -0.818, -0.806, -0.857$, $P < 0.05$)。

3 讨论

本研究中采用 LAS 灌胃妊娠小鼠, 并以生理盐水灌胃为对照, 观察了胚胎期 LAS 暴露对子代小鼠卵巢

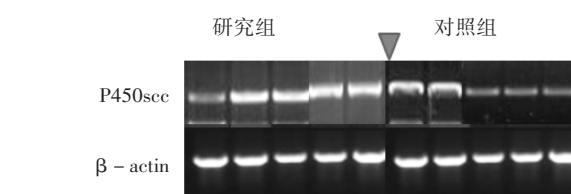


图 2 两组子代雌性小鼠卵巢 P450_{scc} mRNA 相对表达量类固醇激素合成的影响。结果显示, 相对于生理盐水对照组, LAS 灌胃妊娠小鼠的子代雌性小鼠的血清 FSH, LH, E_2 , T 等类固醇激素水平及卵巢 StAR 和 P450_{scc} mRNA 相对表达量均降低, 其机制可能为 LAS 导致的生殖细胞结构破坏和凋亡导致类固醇激素合成能力降低, 可引发生殖系统功能紊乱, 降低生殖系统功能。LAS 为表面活性剂的主要成分, 而表面活性剂在日常洗涤中应用普遍, 因此人体普遍暴露在 LAS 中, 虽量较小, 但长期蓄积可能对人体造成一

本栏目由
重庆赢英康医疗器械有限公司
协办

定影响^[6-7]。人体中生殖器官极易受到环境因素的影响,而胚胎期及青春期生殖系统发育高峰若受到化学污染物的影响可影响生殖细胞功能,导致体内内分泌异常,影响生殖系统激素合成分泌,影响生殖功能^[8-10]。窦晓卫等^[11]和韩海艳等^[12]的研究均证实了LAS在生殖能力上的负面作用,这与本研究结果一致。故对LAS相关生殖系统不良影响进行防治十分重要,明确LAS在生殖系统中的具体影响及其机制可为其相关不良影响的防治提供依据。

LAS进入人体后需氧化降解,因此可引发体内自由基水平的明显升高,从而导致脂质过氧化增强和抗氧化酶活力降低^[13]。已有研究证实,LAS可引发抗氧化能力的降低而导致肝脏功能损伤^[14-15]。因此,氧化应激的增强亦可能为LAS影响卵巢类固醇激素合成的重要途径。本研究中亦关注了LAS对子代雌性小鼠氧化应激状况的影响,结果显示,相对于生理盐水对照组,LAS灌胃妊娠小鼠的子代雌性小鼠的血清SOD活力降低而血清MDA水平则升高,其氧化应激反应严重,而抗氧化应激能力降低,进一步证实了“LAS通过促进氧化应激导致妊娠小鼠的子代雌性小鼠卵巢类固醇激素合成功能降低”的假设,亦与赵文红等^[14-15]的研究中LAS通过氧化应激途径影响细胞功能,造成器官损伤的结论一致,提示抗氧化可能为减轻LAS对机体造成不良影响的途径。

本研究结果显示,随着LAS灌胃妊娠小鼠的子代雌性小鼠血清SOD活力的降低,其血清FSH,LH,E₂,T等类固醇激素水平同步降低,而随着血清MDA水平的升高,其血清FSH,LH,E₂,T等类固醇激素水平规律下降^[16],提示其氧化应激指标可能与血清类固醇激素水平及卵巢StAR和P450_{scc} mRNA相对表达量相关。进一步的Pearson线性相关分析结果显示,研究组子代雌性小鼠血清SOD活力与其血清类固醇激素水平及卵巢StAR和P450_{scc} mRNA相对表达量均呈正相关,其血清MDA水平与其血清类固醇激素水平及卵巢StAR和P450_{scc} mRNA相对表达量则呈负相关,受LAS影响妊娠小鼠的子代雌性小鼠氧化应激状态异常,且与其类固醇激素水平和卵巢类固醇激素合成能力相关,进一步证实了胚胎期LAS通过促进氧化应激导致妊娠小鼠的子代雌性小鼠卵巢类固醇激素合成功能降低。

综上所述,LAS可影响雌性小鼠卵巢类固醇激素合成,而氧化应激可能为LAS影响卵巢类固醇激素合成的机制和干预依据。在LAS暴露广泛的情况下,适当抗

氧化干预可能减少其对子代卵巢类固醇激素合成的影响,改善子代生殖系统功能,尚需进一步研究证实。

参考文献:

- [1] 孟 晔,吕萍萍,黄荷凤. 孕期不良暴露与成年期疾病[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2015,34(4):304-308.
- [2] 黄鹤归. 孕期不良环境与胎源性疾病[J]. 医学新知杂志,2013,23(5):309-311.
- [3] 赵文红,张 雯. 直链烷基苯磺酸钠对小鼠皮肤组织老化的促进作用[J]. 中国老年学杂志,2017,37(4):825-827.
- [4] Souza LF, Florencio L, Gavazza S, et al. Methanogenic activity inhibition by increasing the linear alkylbenzene sulfonate(LAS) concentration[J]. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng,2016,51(8):656-660.
- [5] 张 颖,任春娥,乔鹏云,等. 直链烷基苯磺酸钠对雄性小鼠生精功能亚慢性毒性作用研究[J]. 生殖医学杂志,2012,21(5):459-464.
- [6] Motteran F, Braga JK, Silva EL, et al. Kinetics of methane production and biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate from laundry wastewater[J]. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng,2016,51(14):1288-1302.
- [7] Zhu W, Chen H, Guo L, et al. Effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the interspecific competition between *Microcystis* and *Scenedesmus*[J]. Environ Sci Pollut Res Int,2016,23(16):16194-16200.
- [8] 黄秋驰,王燕燕,杨 燕,等. 环境中镉暴露对生殖系统影响的研究进展[J]. 环境卫生学杂志,2014,4(4):413-417.
- [9] 马明月,张玉敏. 孕期暴露双酚A对子代雌性大鼠卵巢类固醇激素合成的影响[J]. 工业卫生与职业病,2015,41(1):7-10.
- [10] 赵文红,张 鼎,周纯先,等. 直链烷基苯磺酸钠对黑腹果蝇生殖能力及寿命的影响[J]. 中南大学学报(医学版),2011,36(2):154-158.
- [11] 窦晓卫,任春娥,柏宏伟,等. 直链烷基苯磺酸钠对小鼠精子成熟和生育能力的影响[J]. 辽宁医学院学报,2013,34(1):12-14.
- [12] 韩海艳,任春娥,乔鹏云,等. LAS对雄性小鼠及其子代生精功能毒性作用的研究[J]. 现代妇产科进展,2013,22(8):622-625.
- [13] 赵文红,王金花. 直链烷基苯磺酸钠致小鼠皮肤组织氧化应激及胶原改变[J]. 中南大学学报(医学版),2015,40(6):585-591.
- [14] 赵文红,张建国,江城梅. 直链烷基苯磺酸钠致小鼠肝脏氧化损伤的作用[J]. 第三军医大学学报,2012,34(7):605-608.
- [15] 赵文红,赵 红,王开磊,等. 直链烷基苯磺酸钠致人张氏肝细胞损伤的毒性作用[J]. 卫生研究,2016,45(2):263-267.
- [16] 赵文红,崔慧娟. 茶多酚对直链烷基苯磺酸钠致小鼠皮肤损伤的保护作用[J]. 茶叶科学,2016,36(5):461-468.

(收稿日期:2018-01-10;修回日期:2018-03-05)